

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

# **Fosforilacija proteina u biljaka**

## **Plant protein phosphorylation**

SEMINARSKI RAD

Matija Šimac

Preddiplomski studij Molekularne biologije

Mentor: doc.dr.sc. Biljana Balen

Zagreb, 2010.

## POPIS KORIŠTENIH KRATICA

SAHAROZA FOSFAT SINTAZA	SPS
BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1	BRI1
FOSFOSERIN	pS
AKTIVNI KISIKOVI RADIKALI	ROS

## SADRŽAJ

POPIS KORIŠTENIH KRATICA .....	2
UVOD .....	4
REGULACIJA METABOLIZMA UGLJIKA I DUŠIKA .....	5
GRUPA PROTEINA 14-3-3 .....	7
OKSIDATIVNA SIGNALIZACIJA U BILJNIM STANICAMA .....	9
LITERATURA.....	10
SAŽETAK.....	11
SUMMARY .....	12

## UVOD

Signalizacija u biljaka i fotosinteza su u vrlo bliskom odnosu. Fotosinteza je vrlo važan mehanizam koji nudi asimilate koji su potrebni za rast same biljke, stoga i hranu i vlakna koja podržavaju sav životinjski svijet. Biljke koriste Sun evu energiju za fiksaciju ugljikovog dioksida iz atmosfere, reduciraju i asimiliraju i ugljik u ugljikohidrate te otpuštaju kisik iz vode [1]. Listovi transpiriraju vodu koja se uzima korijenom te provodi ksilemskim sustavom zajedno s anorganskim tvarima koje su vrlo važne za biljni rast.

Jedna od tih anorganskih tvari su nitratne soli iz zemlje koje su biljkama glavni izvor dušika. Iznimka su dakako mahunarke koje žive u simbiozi sa bakterijama koje reduciraju dušik iz atmosfere te ga u obliku amonijaka predaju biljci. U ostalim se biljkama dušik do listova doprema u obliku nitrata. Nitrat se prvo reducira do amonijaka i zatim se ugrađuje u aminokiseline i su ugljikohidratni kosturi sintetizirani fotosintezom. Aminokiseline koje se sintetiziraju zajedno sa šećerima (posebno saharozu) kao produkti fotosinteze se ubacuju u floem biljke i njime se prenose do ostalih organa, plodova, korijenja i meristema. Ti transportni mehanizmi pružaju vezu između fotosinteze i biljnog rasta.

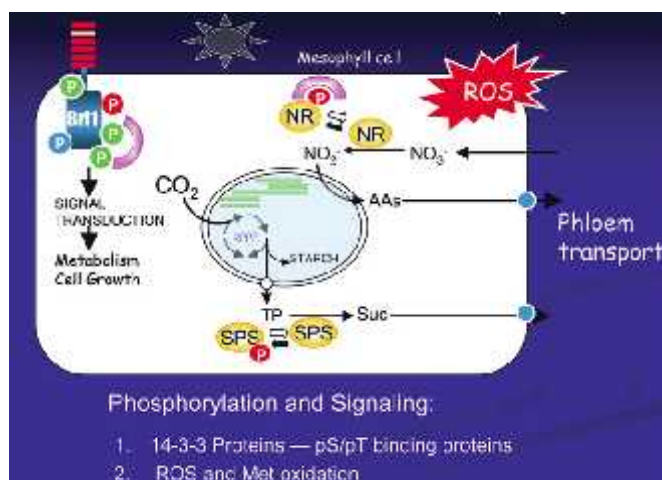
Protein-protein interakcije imaju vrlo važnu ulogu u staničnim procesima kao što su signalna transdukcija, regulacija životnog ciklusa stanice, metabolička regulacija. Stoga je regulacija samih proteinskih interakcija u nekom vremenu i prostoru vrlo značajna za preživljavanje, kako na staničnoj razini, tako i cijelog organizma. Jedan od glavnih načina kontrole tih interakcija je posttranslacijskom modifikacijom kao što je fosforilacija.

Reverzibilna fosforilacija specifičnog aminokiselinskog ostatka unutar fosfoprotein-vezujućih domena ciljanog proteina protein kinazama može uzrokovati promjene u konformaciji i naboju. Te promjene mogu dovesti do stvaranja novih mjesta za fosfopeptid-vezujuće proteine na ciljanom proteinu [16].

# REGULACIJA METABOLIZMA UGLJIKA I DUŠIKA

Najvažniji korak u regulaciji metabolizma je fosforilacija proteina, odnosno enzima koji sudjeluju u samom metaboličkom putu. Fosforilacija ima važnu ulogu u koordiniranju i smještanju reakcija metabolizma izmeđ u citoplazme i kloroplasta.

Ugljikov dioksid se fiksira u kloroplastima, koriste i enzime reduktivnog puta pentoza fosfata. Kloroplasti su također i mjesto sinteze i odlaganja škroba, ali saharoza se sintetizira u citoplazmi. Intermedijeri iz puta pentoza fosfata se otpuštaju iz kloroplasta u obliku trioza fosfata za sintezu saharoze. Enzim saharoza fosfat sintaza (SPS) je važna kontrolna točka u tom metaboličkom putu. Aktivnost tog enzima je reverzibilno kontrolirana fosforilacijom u odnosu na signale svjetla i tame. Kad je list u tami i ne odvija se fotosinteza, SPS je fosforilirana na Ser-158 i prevedena u stanje male aktivnosti. U tom trenutku izvor ugljika za



**Slika 1. Pojednostavljeni prikaz fosforilacijskih puteva tijekom sinteze aminokiselina i ugljikohidrata u modelu lista sa jednim kloroplastom.** NR-nitrat reduktaza; SPS-saharozna fosfat sintaza; Bri1- BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1

sintezu saharoze je malen, a ugljik koji je dostupan dolazi gotovo u potpunosti iz razgradnje škroba. U uvjetima svijetla enzim je u svojoj aktivnijoj nefosforiliranoj formi. Stoga fosforilacija koordinira sinkronizaciju sinteze saharoze iz intermedijera, koji su produkti fotosinteze, s dostupnosti tih intermedijera (Slika 1.).

Metabolički put kroz koji se nitrat asimilira također uključuje citoplazmu i kloroplaste. Započinje redukcijom nitrata do nitrita koje katalizira nitrat reduktaza, dok se taj nitrit dalje reducira u kloroplastu. Ovo je također strogo reguliran proces u ovisnosti o svjetlu i tami jer nitrat reduktaza koristi reducirani ferredoksin, koji se aktivira fotokemijski kao nositelj elektrona. Amonijak se ugrađuje u aminokiseline, koje se prenose floemom do heterotrofnih organa (organa koji sami ne mogu fotosintetizirati i time si stvarati hranu i metabolite). Kako bi se spriječilo nakupljanje toksa njihovih produkata važno je da se njihova proizvodnja regulira

svjetlom. Ta regulacija također uključuje fosforilaciju. Fosforilirani oblik nitrat reduktaze nije aktivan (taj oblik je zastupljen u tami) dok je aktivan oblik defosforiliran. U listu špinata fosforilacijsko mjesto nitrat reduktaze je također serinski ostatak, Ser-543, [2]. Za razliku od SPS-a sama fosforilacija odnosno defosforilacija ne ima tako veliki utjecaj na aktivnost nitrat reduktaze. Fosforilacija formira na enzimu mjesto za inhibitorni protein koji je dio grupe proteina 14-3-3, koji se tada može vezati i tvoriti neaktivni kompleks (Slika 1.).

Nitrat reduktaza je jedan od prvih otkrivenih enzima koji se vežu za te proteine. Kasnije je dokazano da su proteini 14-3-3 signalni proteini koji se vežu na fosforilirane serinske i treoninske ostatke i da stupaju u interakciju sa raznovrsnim proteinima i u biljkama i u životinjama [4].

Druga grupa proteina poznata da stupaju u interakciju s grupom proteina 14-3-3 su receptorske kinaze. To je velika grupa proteina pronađena u biljaka i životinja. Na primjer, genom biljke *Arabidopsis* kodira preko 600 takvih kinaza. Velika većina receptora nemaju poznatu ulogu niti poznatih liganada. Bolje istražena receptor kinaza je protein poznat pod nazivom BRI1 (*BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1*), koja je uključena u signalni put brassinosteroida (Slika 1.) [5]. Brassinosteroidi su esencijalni regulatori rasta u biljkama. BRI1 je jako fosforilirana, s 15 potencijalnih autofosforilacijskih mjesta unutar citoplazmatske kinazne domene [6]. Zanimljivo je da svako od tih mjesta ima drugu ulogu funkciju. Nedavno je otkriveno da se grupa proteina 14-3-3 veže za signalne komplekse BRI1 i može utjecati na aktivnost i stabilnost BRI1 kompleksa. [17]. Jedan od načina formiranja kompleksa BRI1 je povećanje koncentracije citosolnih enzima među koje spada i nitrat reduktaza. Za sada je poznato da brassinosteroidi utječu na rast, ali su odgovorni i za toleranciju biljke na stres. Dakako, samo stvaranje kompleksa BRI1 i sam utjecaj na metaboličke puteve se mora dodatno istražiti.

## GRUPA PROTEINA 14-3-3

Proteini u grupi 14-3-3 su visoko konzervirani u smislu strukture i sekvence. Struktura proteina 14-3-3 iz duhana je vrlo slična strukturi nađenoj u ljudima [7]. Ti proteini su male grupe  $\alpha$ -helixa i dimeri su u nativnom obliku, gdje N-kraj tvori vezu između dva polipeptidna lanca (Slika 2.). Oni vežu fosforilirane proteine u pukotinu između podjedinica, vezuju i se na jednostavne motive koji uključuju fosforilirane serinske ili treoninske ostatke (pS ili pT), najčešće RSXpS/pTXP ili RXXXpS/pTXP (gdje je X bilo koji aminokiselinski ostatak) [8]. Ti kratki motivi su obično vrlo česti i većina animalnih i biljnih stanica može sadržavati više od 100 različitih proteina koji stupaju u interakciju s grupom proteina 14-3-3. Poznato je da igraju vrlo široku ulogu u regulaciji. Na vezanje proteina 14-3-3 na svog 'klijenta' utječu drugi faktori, kao što je npr. lokalizacija u stanici.

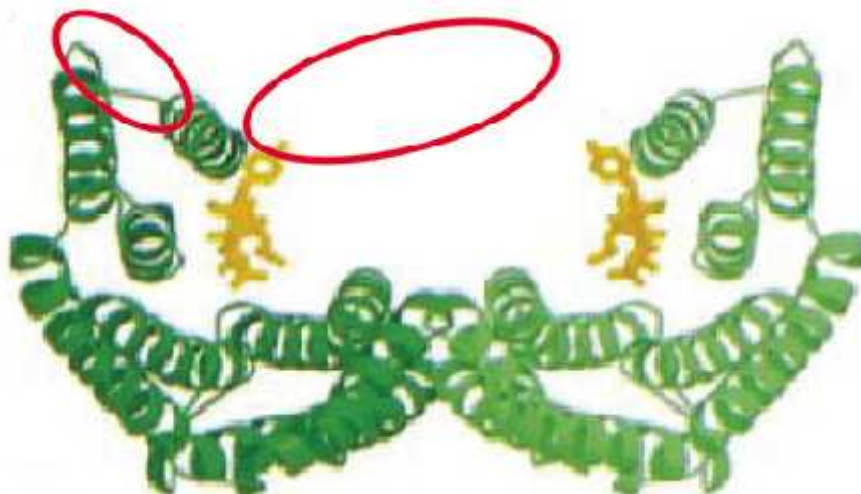
SPS i nitrat reduktaza su u uvjetima mraka u svom inaktivnom obliku, kako bi se u listovima razgradnjom škroba proizvodila saharoza koja je u tom trenutku potrebna biljci. Kada se listovi postave na svjetlo dolazi do povećanja fotosinteze, proizvodnje saharoze te redukcije nitrata. Kada opet uklonimo svjetlo, aktivnost nitrata reduktaze je veća od aktivnosti SPS-a. Inaktivni oblik nitrata reduktaze je fosforiliran i vezan na inhibitorni protein 14-3-3. Regulatorna fosforilacijska domena se nalazi unutar regije poznate kao *hinge 1*, koja drži dvije redoks-aktivne domene. Ta domena je uključena u regulaciju enzima posttranslacijskom modifikacijom.

U ranim studijama ovog sustava, određeno je da je magnezij potreban kako bi nitrat reduktaza bila u svom inaktivnom obliku, te da je enzimska aktivnost povraćena uklanjanjem magnezija. Još uvijek ima nekoliko teorija o ulozi magnezija. Favorizira se ideja da stimulira vezanje 14-3-3 na fosforiliranu nitrat reduktazu [9]. No, nema apsolutne potrebe za magnezijem ili čak za nekim drugim dvovalentnim kationom: inhibitori 14-3-3 postaju aktivni dodatkom kalcija, mangana ili poliamin spermina (ima četiri pozitivna naboja), što ukazuje da je vezno mjesto vrlo fleksibilno [11]. Spermin je aktivan pri mikromolarnim koncentracijama, dok metalni kationi pri milimolarnim. Zanimljivo je da su to koncentracije koje se nalaze *in vivo*. Mjesno-specifična mutageneza te ostali eksperimenti su pokazali da je kation vezno

mjesto na 14-3-3 proteinu vrlo negativno nabijeno. Jedan mutant koji na 208. mjestu ima zamijenjen glutamat s alaninom aktivni je inhibitor i bez kationa, a dodatkom kationa postajao je aktivniji [11]. Vezanje inhibitora se može tako er stimulirati i niskim pH.

Mogu nost da 14-3-3 protein stupa u interakciju sa nitrat reduktazom traži konformacijsku promjenu. Bez kationa, C-terminalni polipeptid ostaje u utoru za vezanje fosfopeptida, gdje tvori inaktivni, 'zatvoreni' oblik i ponaša se kao autoinhibitor. Osjetljivost na katione se uvelike može smanjiti ako maknemo taj C-terminalni polipeptid. Ta regija proteina je hipervarijabilna, s izoformama koje se razlikuju u duljini i sekvenci, te je varijabilnost vjerojatno odgovorna za specifi nost izoformi.

Proteini 14-3-3 vežu razli ite proteine klijente, ali ovisnost o kationima je varijabilna [13]. U nekim slu ajevima , vezanje proteina iz grupe 14-3-3 za nitrat reduktazu je inhibirano, dok u nekim slu ajevima kationi nemaju gotovo nikakve uloge na vezanje. Svi kationi utje u na iste proteinske interakcije, što sugerira, kako se koncentracija kationa mijenja, na primjer, kao odgovor na stres, sklonost 14-3-3 proteina za vezanje na razli ite ciljane proteine e se tako er mijenjati.



**Slika 2. Struktura dimernog proteina 14-3-3 iz lista duhana.** U sredini je vidljiv spoj izme u dviju podjedinica preko N-terminusa i vezno mjesto za fosforilirane polipeptide u šupljini izme u podjedinica. Macmillan Publishers Ltd: EMBO J. [7],



## OKSIDATIVNA SIGNALIZACIJA U BILJNIM STANICAMA

Razina fosforilacije proteina se također mijenja u odgovoru na prisutnost ROS-a. Oni se proizvode u mnogim staničnim dijelovima kao odgovor na hormone koji reguliraju normalni biljni rast i razvoj, kao i na razne abiotičke i biotičke stresove [14]. Nije još potpuno poznato kako stanica osijeti koliko se nakupilo ROS-a niti kako se taj signal prenosi. Receptori specifični za ROS nisu pronađeni. Postoje naznake da se količina ROS-a osijeti preko posttranslacijskih modifikacija. Cisteinski ostaci su poznati kao jako osjetljivi na blagu oksidaciju. Određeni broj proteina koji imaju ulogu u oksidativnoj signalizaciji, uključujući i redoks-osjetljive transkripcijske faktore i metaboličke enzime, imaju reaktivne cisteine u aktivnim mjestima i inaktivirani su oksidacijom tog cisteina [15]. Metioninski ostaci su također podložni za oksidaciju, moguće i više od cisteina, što pokazuju najnoviji eksperimentalni podatci.

Metioninski ostatak je vrlo hidrofoban u reduciranom obliku. Blagom oksidacijom reverzibilno se prelazi u mnogo polarniji sulfoksid (MetSO). Ova modifikacija se popravljala peptid metionin sulfoksid reduktazom, ali biljne i životinjske stanice u svom normalnom stanju će uvijek imati nekoliko MetSO ostataka. Jakša oksidacija rezultira ireverzibilnim prijelazom sulfoksida u sulfon (MetO<sub>2</sub>) koji se može popraviti jedino degradacijom proteina. Moguće je da se ta sklonost da se metioninski ostaci oksidiraju koristi za signalizaciju ROS-a.

Kanonski serin/treonin motiv za fosforilaciju koji je naveden u SPS i nitrat reduktazi, sadrži konzervirani argininski ostatak na -3 poziciji i veliki hidrofobni ostatak na -5 poziciji. Ako se bilo koji od ovih ostataka zamijeni alaninom, fosforilacijsko mjesto se ne može prepoznati. Metionin je jedan od hidrofobnih ostataka koji se često nalazi na tom -5 mjestu. Trenutno se istražuje da li ova oksidacija metioninskog ostatka (prijelaz iz Met u MetSO), koja ga čini hidrofilnijim, utječe na fosforilaciju, budući da mnoge kinaze imaju te konzervirane motive. Pošto se količina ROS povećava starenjem i bolestima moguće je da je odgovor na metioninsku oksidaciju upravo fosforilacija proteina.

## LITERATURA

- 1 Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R. (2006) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ
- 2 Bachmann, M., Shiraishi, N., Campbell, W.H., Yoo, B.-C., Harmon, A. and Huber, S.C. (1996) *Plant Cell* **8**, 505–517
- 3 DeLille, J.M., Sehnke, P.C. and Ferl, R.J. (2001) *Plant Physiol.* **126**, 35–38
- 4 MacKintosh, C. (2004) Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem. J.* **381**, 329–342
- 5 Li, J. (2005) *Curr. Opin. Plant. Biol.* **8**, 526–531
- 6 Wang, X.F., Goshe, M.B., Soderlom, E., Phinney, B.S., Kuchar, J., Li, J., Asami, T., Yoshida, S., Huber, S.C. and Clouse, S.D. (2005) *Plant Cell* **17**, 1685–1703
- 7 Wurtele, M., Jelich-Ottmann, C., Wittinghofer, A. and Oecking, C. (2003) *EMBO J.* **22**, 987–994
- 8 Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J. and Cantley, L.C. (1991) The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**, 961–971
- 9 Athwal, G.S., Huber, J.L. and Huber, S.C. (1998) *Plant Cell Physiol.* **39**, 1065–1072
- 10 Athwal, G.S., Lombardo, C.R., Huber, J.L., Masters, S.C., Fu, H. and Huber, S.C. (2000) *Plant Cell Physiol.* **41**, 523–533
- 11 Athwal, G.S. and Huber, S.C. (2002) *Plant J.* **29**, 119–129
- 12 Shen, W., Clark, A.C. and Huber, S.C. (2003) *Plant J.* **34**, 473–484
- 13 Shen, W. and Huber, S.C. (2006) *Plant Cell Physiol.* **47**, 764–771
- 14 Neill, S., Desikan, R. and Hancock, J. (2002) *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 388–395
- 15 Moran, L.K., Gutteridge, J.M. and Quinlan, G.J. (2001) *Curr. Med. Chem.* **8**, 763–772
- 16 Gökirmak T., Paul A. L., Ferl R. J. (2010) *Curr. Opinion in Plant Biology* **13**:1-6
- 17 M.-H. Oh and S.C. Huber, neobjavljen rad

## SAŽETAK

Signalizacija u biljaka i fotosinteza su u vrlo bliskom odnosu. Fotosinteza je vrlo važan mehanizam koji nudi asimilate koji su potrebni za rast same biljke, stoga i hranu i vlakna koja podržavaju sav životinjski svijet. Protein-protein interakcije imaju vrlo važnu ulogu u stani nim procesima kao signalnoj transdukciji, regulaciji životnog ciklusa stanice, metaboli koj regulaciji. Regulacija samih proteinskih interakcija u nekom vremenu i prostoru je vrlo zna ajna za preživljavanje kako na stani noj razini tako i cijelog organizma.

Reverzibilna fosforilacija specifi nog aminokiselinskog ostatka unutar fosfoprotein-vezuju e domene ciljanog proteina protein kinazama može uzrokovati promjene u konformaciji i naboju. Te promjene mogu dovesti do stvaranja spojnih mjesta za fosfopeptid-vezuju e proteine na ciljanom proteinu. U uvjetima svjetla enzim je u svojoj aktivnijoj defosforiliranoj formi. Nitrat reduktaza je jedan od prvih otkrivenih enzima koji se vežu za proteine 14-3-3. Kasnije je dokazano da su proteini 14-3-3 signalni proteini koji se vežu na fosforilirane serinske i treoninske ostatke i da stupaju u interakciju s raznovrsnim proteinima i u biljkama i u životinjama. Proteini 14-3-3 vežu fosforilirane proteine u pukotinu izme u podjedinica, vezuju i se na jednostavne motive koji uklju uju fosforilirane serinske ili treoninske ostatke (pS ili pT). U nekim je slu ajevima vezanje proteina iz grupe 14-3-3 za nitrat reduktazu inhibirano (kad je koncentracija kationa vrlo niska), dok u nekim slu ajevima kationi nemaju gotovo nikakve uloge na vezanje. Svi kationi utje u na iste proteinske interakcije, što sugerira- kako se koncentracija kationa mijenja, na primjer, kao odgovor na stres, sklonost proteina 14-3-3 za vezanje na razli ite mete e se tako er mijenjati. Razina fosforilacije proteina se tako er mijenja u odgovoru na prisutnost ROS-a. Oni se proizvode u mnogim stani nim dijelovima, kao odgovor na hormone koji reguliraju normalni biljni rast i razvoj, kao i na razne abioti ke i bioti ke stresove. Metioninski ostatak je vrlo hidrofoban u reduciranom obliku. Blagom oksidacijom reverzibilno prelazi u mnogo polarniji sulfoksid (MetSO). Ova modifikacija se popravljja peptid metionin sulfoksid reduktaza, ali biljne i životinjske stanice u normalnom stanju e uvijek imati nekoliko ostataka MetSO. Ja a oksidacija rezultira ireverzibilnim prijelazom sulfoksida u sulfon (MetO<sub>2</sub>) koji se može popraviti jedino degradacijom proteina. Mogu e je da se ta sklonost da se metioninski ostatci oksidiraju koristi za signalizaciju ROS-a.

## SUMMARY

Signaling in plants and photosynthesis are in a very close relationship. Photosynthesis is a very important mechanism that offers assimilates required for plant growth and growth for all other organisms depending on plants. Protein-protein interactions play a very important role in cellular processes such as signal transduction, regulation of the life cycle of cells, metabolic regulation. Therefore, regulation of protein interactions at a specific time and space is very important for the survival on the cellular level and for an organism. Reversible phosphorylation of specific amino acid residue within the phosphoprotein-binding domain of protein kinase target protein, can cause changes in conformation and charge. These changes may lead to the formation of docking places for fosfopeptid-binding proteins on the target protein. In light conditions the enzyme is in its active dephosphorylated form. Nitrate reductase is one of the first enzymes discovered that bind to 14-3-3 proteins. Later it was proved that 14-3-3 proteins are signaling proteins that bind to serin and threonin. Phosphorylated serine residues interact with various proteins (known as client proteins) in plants and animals. 14-3-3 proteins bind phosphorylated proteins in a cleft between the subunits, binding to simple motifs that include phosphorylated threonin or serine residues (pS or pT). In some cases, the binding of 14-3-3 with nitrate reductase was inhibited, as in some cases cations have almost no role in binding. All cations affect the same protein interactions, which suggest that changes in cation conentation, (such as stress response), will change the tendency of 14-3-3 protein binding to different targets. The level of protein phosphorylation also changes in response to ROS. They are produced in many parts of the cell as response to hormones that regulate normal plant growth and development as well as a variety of abiotic and biotic stresses. Methionine residue is very hydrophobic in reduced form. Mild reversible oxidation produces a much more polar sulfoxide (MetSO). This modification repairs peptide methionine sulfoxide reductase, but plant and animal cells in basal metabolism will always have a few residue of the MetSO. Stronger oxidation results in an irreversible conversion into the sulfone (MetO<sub>2</sub>) that can only be repaired by protein degradation. It is possible that this propensity for methionine residues to oxidize may be exploited in response to signalling by ROS.